

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP05/006253

International filing date: 31 March 2005 (31.03.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP
Number: 2004-107031
Filing date: 31 March 2004 (31.03.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 20 May 2005 (20.05.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application: 2 0 0 4 年 3 月 3 1 日

出 願 番 号
Application Number: 特 願 2 0 0 4 - 1 0 7 0 3 1

パリ条約による外国への出願
に用いる優先権の主張の基礎
となる出願の国コードと出願
番号

The country code and number
of your priority application,
to be used for filing abroad
under the Paris Convention, is

J P 2 0 0 4 - 1 0 7 0 3 1

出 願 人
Applicant(s): 明 治 乳 業 株 式 会 社

2 0 0 5 年 4 月 2 7 日

特 許 庁 長 官
Commissioner,
Japan Patent Office

小 川



【書類名】	特許願
【整理番号】	M1-A0403
【提出日】	平成16年 3月31日
【あて先】	特許庁長官 殿
【発明者】	
【住所又は居所】	神奈川県小田原市成田 5 4 0 明治乳業株式会社 研究本部内
【氏名】	桑 久枝
【発明者】	
【住所又は居所】	神奈川県小田原市成田 5 4 0 明治乳業株式会社 研究本部内
【氏名】	佐々木 一
【特許出願人】	
【識別番号】	000006138
【氏名又は名称】	明治乳業株式会社
【代理人】	
【識別番号】	100102978
【弁理士】	
【氏名又は名称】	清水 初志
【選任した代理人】	
【識別番号】	100108774
【弁理士】	
【氏名又は名称】	橋本 一憲
【手数料の表示】	
【予納台帳番号】	041092
【納付金額】	21,000円
【提出物件の目録】	
【物件名】	特許請求の範囲 1
【物件名】	明細書 1
【物件名】	図面 1
【物件名】	要約書 1

【書類名】 特許請求の範囲

【請求項 1】

糖質、タンパク質、脂質、食物繊維の少なくともいずれか一つを含み、且つ発酵乳製品を含む、酸性抗グラム陽性菌組成物。

【請求項 2】

糖質、タンパク質、脂質、食物繊維の少なくともいずれか一つを含み、且つ発酵乳製品を含む、酸性抗黄色ブドウ球菌組成物。

【請求項 3】

糖質、タンパク質、脂質、食物繊維の少なくともいずれか一つを含み、且つ発酵乳製品を含む、酸性抗MRSA組成物。

【請求項 4】

糖質、タンパク質、脂質、食物繊維の少なくともいずれか一つを含み、且つ発酵乳製品を含む、酸性抗虫歯菌組成物。

【書類名】 明細書

【発明の名称】 抗菌性組成物

【技術分野】

【0001】

本発明は、抗菌活性を有する組成物に関する。

【背景技術】

【0002】

流動食は、経口的な栄養摂取が困難な場合や嚥下障害がある場合等に病院や老人施設等で広く使用されている。流動食は鼻腔、PEG（Percutaneous Endoscopic Gastrostomy）等から挿入されたカテーテル、チューブを通じて体内に注入されるが、一般的に流動食利用者は高齢者や何らかの疾患を有する患者であり、免疫力が低下していることが多く、病原菌に感染しやすい。

【0003】

このような易感染者が多い施設で感染が一度発生すると、時には、医療従事者等を通じて院内感染・施設内感染に発展することがある。院内感染防止対策への認識が高まってきたものの、高齢者の増加、耐性菌の出現等により院内感染の問題はますますクローズアップされている。国内の院内感染菌は、1970年代までは緑膿菌が主流であったが、1980年以降はMRSAが院内感染菌の首位を占めるようになった。MRSAは抗生物質に抵抗性を示すため、特に対策を要する病原菌である。

【0004】

流動食に抗菌作用があれば易感染者への感染防御手段の一つとなりうるが、これまでに流動食の抗菌作用について報告はない。

【非特許文献1】 Goepfert, J.M., Chung, K.C., Behavior of salmonellae in sliced luncheon meats, Appl Microbiol, 19, 190-192, 1970

【非特許文献2】 中江悦郎著、乳・肉・卵の科学、弘学出版、p132-137、1996

【非特許文献3】 Kawai Y., Saito, T., Kitazawa, H., and Itoh T., Biosci. Biotech. Biochem. 62, 22438-40, 1998

【非特許文献4】 Shah, N.P.: Some beneficial effects of probiotic bacteria, Bioscience Microflora, 19, 2, 99-106, 2000

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

本発明は、感染防御手段となり得る抗菌活性を有する組成物の提供を課題とする。

【課題を解決するための手段】

【0006】

上記課題を解決すべく、本発明者らは酸性流動食に着目した。流動食は中性に調製されるのが通常であるが、本発明者らが着目した酸性流動食はタンパク質源として乳発酵製品を含むために酸性となっている。ヨーグルトなどの発酵乳に抗菌作用があることは既に知られている。また微生物が酸性環境に弱いことも周知である。しかし、本発明者らが酸性流動食による抗菌作用を検討したところ、予想外なことに、該酸性流動食はグラム陽性菌に対し、原料である乳発酵製品よりも強い抗菌作用を示した。すなわち、本発明は抗グラム陽性菌作用を有する組成物に関し、具体的には下記のとおりである。

（1）糖質、タンパク質、脂質、食物繊維の少なくともいずれか一つを含み、且つ発酵乳製品を含む、酸性抗グラム陽性菌組成物、

（2）糖質、タンパク質、脂質、食物繊維の少なくともいずれか一つを含み、且つ発酵乳製品を含む、酸性抗黄色ブドウ球菌組成物、

（3）糖質、タンパク質、脂質、食物繊維の少なくともいずれか一つを含み、且つ発酵乳製品を含む、酸性抗MRSA組成物、

（4）糖質、タンパク質、脂質、食物繊維の少なくともいずれか一つを含み、且つ発酵乳製品を含む、酸性抗虫歯菌組成物。

【発明の効果】

【0007】

本発明により、新たな酸性抗グラム陽性菌組成物が提供された。本発明の組成物は、流動食または経腸栄養剤として利用することにより、高齢者等の易感染者に対し、抗生物質以外の感染防御手段となり得る。流動食自体が抗菌作用を有することから、カテーテル等を通じた院内感染の防止には簡便で有効な方法といえることができる。特に、日和見感染の代表的起因微生物であるMRSAに対し高い効果を有する点で実用性が高い。また、本発明組成物は、経口の抗グラム陽性菌食品または医薬品としても利用可能である。

【発明を実施するための最良の形態】

【0008】

本発明は、酸性抗グラム陽性菌組成物（以下、本発明の組成物）を提供する。本発明者らは、酸性流動食の抗菌作用を確認し、特にグラム陽性菌に対して優れた抗菌作用を見出したことに基づく。本発明の組成物は、酸性を示す。好ましくはpH 5.0未満、より好ましくはpH 4.8未満、最も好ましくはpH4.4未満である。

【0009】

本発明の組成物は、糖質、タンパク質、脂質、食物繊維の少なくともいずれか一つを含む。本発明の組成物に用いることのできる糖質の具体例としては、ハチミツ、デキストリン、ショ糖、パラチノースを主とし、ブドウ糖、グラニュー糖、果糖、水飴、糖アルコール（ソルビトール、キシリトール、マルチトールなど）等を挙げることができる。本発明の組成物に用いることのできるタンパク質は、カゼイン、乳清タンパク質などの乳由来タンパク質、大豆タンパク質、これらタンパク質のトリプシン、ペプシンなどの動物由来酵素およびニュートラーゼ、アルカラゼによる加水分解物を例示することができる。本発明の組成物に用いることのできる脂質は、第1価飽和脂肪酸、多価不飽和脂肪酸を含むヒマワリ油、ナタネ油、オリーブ油に加え、コーン油、大豆油、パーム油、中鎖脂肪酸、EPA、DHA、大豆由来リン脂質、乳由来リン脂質などを含む。食物繊維は水溶性食物繊維と非水溶性食物繊維とに分けられ、両者のいずれを用いてもよい。水溶性食物繊維としてはペクチン（プロトペクチン、ペクチニン酸、ペクチン酸）、グァーガム加水分解物、グルコマンナン、ガラクトマンナン、サイリウム、コーンファイバー、アルギン酸、アルギン酸分解物、カラアギナン、難消化性デキストリンなどを含むことができる。非水溶性繊維としては結晶セルロース、ビートファイバー、小麦ふすま等を例示することができる。好適には、ペクチン、グァーガム加水分解物、難消化性デキストリンを用いることができる。糖質、タンパク質、脂質、食物繊維のいずれについても、抗グラム陽性菌活性を有する限り、上記具体例に限らず他の成分を含むことができる。

【0010】

本発明の組成物は、発酵乳製品を含む。本発明における発酵乳製品とは、牛乳、水牛乳、ヤギ乳、羊乳、馬乳等の家畜乳および／またはこれらの脱脂乳を乳酸菌によって発酵させたものの全般をいい、例えば、チーズ、ヨーグルト、発酵乳、乳清（ホエー）、ホエーチーズは本発明における発酵乳製品に含まれる。発酵乳製品であればいずれを含んでいてもよいが、好ましくは、非熟成チーズまたはヨーグルトであり、より好ましくは、クワルクまたはヨーグルトである。本発明におけるチーズとは、乳、バターミルクもしくはクリームを乳酸菌で発酵させ、または乳、バターミルクもしくはクリームに酵素を加えてできた凝乳から乳清を除去したものをいい、固形化や熟成の有無について問わない。クワルクは、非熟成チーズの一種である。発酵乳製品を製造するには、スターターとして*Lactobacillus bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*を主に用いるが、その他に*Streptococcus lactis*, *Streptococcus cremoris*, *Streptococcus diacetylactis*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus fecalis*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus murinus*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus gasseri*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium breve*などの乳酸菌やビフィズスを用いることができる。その他、プロピオニバクテリウム属菌（*Propionibacterium*

m) 等、発酵乳製品の製造に用いられている菌を併用することができる。クワルクは、*Lactobacillus bulgaricus*、*Streptococcus thermophilus*を主に用いて製造される。

【0011】

本発明の組成物は、グラム陰性菌、グラム陽性菌の双方に抗菌効果を有する。特にグラム陽性菌に対しては、優れた効果を発揮する。乳酸菌発酵物の抗菌力は一般に知られるところであるが、グラム陽性菌に対し本発明の組成物は、原料である発酵乳製品よりも優れた抗菌効果を有する。このグラム陽性菌に対する優れた抗菌効果は、発酵乳製品を糖質やタンパク質等と組み合わせ本発明の組成物としたことによって得られる効果である。発酵乳製品を本発明の組成物に加工することによりこのような効果が得られることは、本発明者らが初めて見出した。本発明者らは、実施例に示すように、黄色ブドウ球菌、MRSA、虫歯菌への上記効果を確認した。他のグラム陽性菌、例えば、レンサ球菌 (*Genus Streptococcus*)、腸球菌 (*Genus Enterococcus*)、コリネバクテリウム (*Corynebacterium*)、バシラス (*Bacillus*)、ボツリヌス菌 (*C. botulinum*) 等にも、抗菌性を期待できる。

【0012】

本発明の組成物は、抗菌効果を有する流動食または経腸栄養剤として利用することができる。流動食または経腸栄養剤自体が抗菌効果を有するため、単なる食品としてではなく感染予防目的で利用することができる。高齢者や病院入院患者等の多い施設では、院内感染・施設内感染の有効かつ安全な予防手段になると考えられる。乳幼児向けの抗菌性ベビーフード、一般向けの抗菌性栄養食品としても利用でき、さらには、整腸作用を持つ栄養補助医薬品や虫歯予防用食品として利用することも考えられる。

【0013】

本発明の組成物は、上記乳発酵製品と糖質、タンパク質、脂質、食物繊維の少なくとも一つとを混合して調製する。上記全ての成分を混合してもよく、またその際にビタミン類や生体必須微量金属として硫酸マンガン、硫酸亜鉛、塩化マグネシウム、炭酸カリウム等を添加してもよい。場合によっては、香料やその他の配合物を添加することもできる。混合後に容器に充填し、必要に応じて加熱殺菌処理を施し、流動食または経腸栄養剤とすることができる。本発明の抗グラム陽性菌組成物は酸性であることから、加熱処理は通常よりも緩やかな条件で行うことができる。例えば、中性流動食の加熱殺菌処理はレトルト殺菌条件120-130℃、20-40分、間接殺菌条件140-145℃、4-10秒のところ、本発明組成物は80-90℃で15-30分のレトルト殺菌または95-110℃で20-60秒の間接殺菌が可能である。緩やかな殺菌条件により、風味を良くすることや、熱に弱い成分の配合も可能である。また、本発明の組成物を寒天やゼラチンによりゲル状とすることや、スプレードライ等により顆粒状食品・医薬品とすることや、さらには固形の食品・医薬品とすることも可能である。

【実施例】

【0014】

以下、本発明を実施例に基づきより具体的に説明する。もっとも、本発明は下記実施例に限定されるものではない。

【0015】

【実施例1】酸性流動食による抗菌作用の検討

病原菌に対する酸性流動食の抗菌作用を検討した。試験菌として、*Escherichia coli* 1 F0 3972 (大腸菌)、*Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* 1F0 12732 (黄色ブドウ球菌)、*Pseudomonas aeruginosa* NBRC 13275 (緑膿菌)、*Staphylococcus aureus* 11D 1677 (MRSA)、*Streptococcus mutans* 1F0 13955 (虫歯菌)を用いた。各試験菌を寒天培地に培養後、得られた菌体を滅菌生理食塩水に懸濁し、1mlあたりの菌数が約 10^8 — 10^9 となるように調製し、菌液とした。酸性流動食は、ファイブレンYH (明治乳業(株))を用い、対照に中性流動食 (メイバランス、明治乳業(株))と発酵乳調製液を使用した。発酵乳調製液は、クワルク (発酵乳製品) に無菌蒸留水を添加し、ファイブレンYH中のクワルク濃度 (40g/100ml) と同じ濃度に調製した。100℃、10分の熱処理を行って乳酸菌を殺菌して使用した。

【0016】

酸性流動食または対照100ml中に、大腸菌、緑膿菌、黄色ブドウ球菌、MRSA、または虫歯菌を1ml添加し、37℃で培養した。培養開始3, 6, 24時間後、サンプリングを行い、寒天培地で培養し生菌数を測定した。

【0017】

結果を図1, 2に示す。酸性流動食は各菌種のいずれにも増殖抑制効果を示したが、各菌種への抗菌効果は予想外に興味深いものであった。グラム陰性菌である大腸菌、緑膿菌についての酸性流動食による増殖抑制作用は発酵乳調製液と同程度であった。このことから酸性流動食による上記各菌に対する抗菌作用は、主成分である発酵乳製品中の有機酸の作用によると思われる。中性流動食中では、培養時間と共に、各菌の増殖が促進された（図1）。また、他社の中性流動食についても抗菌作用を検討したが、メイバランスと同様に抗菌作用は認められなかった（データ示さず）。一方、グラム陽性菌である黄色ブドウ球菌、MRSA、虫歯菌についての結果は、酸性流動食による増殖抑制効果は発酵乳調製液よりも顕著に強いことが示された（図2）。このように酸性流動食は、グラム陰性菌、グラム陽性菌のいずれにも抗菌作用を有するのみならず、特にグラム陽性菌に対しては、原料である発酵乳製品の持つ抗菌作用をはるかにしのぐ抗菌作用を有することが明らかになった。

【0018】

【実施例2】有機酸による抗菌作用の検討

酸性流動食の抗菌作用が確認されたことから、酸性流動食の成分組成について調べた。中性流動食、酸性流動食、発酵乳調製液の組成を表1に示す。中性流動食にはpH調製用にクエン酸が含まれているがその他の有機酸はほとんど含まれていない。発酵乳調製液には乳酸発酵による乳酸が405.1mg/100ml含まれていた。酸性流動食には発酵乳調製液よりも約2倍の乳酸が含まれていたが、これは、流動食として必要なカルシウム量を確保する目的で乳酸カルシウムが添加されているためである。酸性流動食と発酵乳製品には、乳酸以外の主要有機酸として、クエン酸、酢酸が多く含まれている。

【0019】

【表1】

	成 分	中性流動食	酸性流動食	発酵乳調製液	単位
一般組成	タンパク質	4.0	4.0	4.0	g
	脂質	2.8	2.8	0.0	g
	炭水化物	15.7	16.1	7.5	g
	灰分	0.8	0.7	0.3	g
	カロリー	100.0	100.0	46.0	Kcal
有機酸	乳酸	0.0	838.8	405.1	mg
	酢酸	1.3	8.5	5.3	mg
	クエン酸	126.2	172.9	34	mg
	蟻酸	1.9	1.9	0.4	mg

【0020】

酸性流動食と発酵乳製品に含まれる主要有機酸について、抗菌作用を検討した。試験菌、菌液の調製は、上述の、酸性流動食の抗菌作用の検討の際と同様にした。被験試料として乳酸1ml、酢酸2.3ml、またはクエン酸1gのいずれか（和光純薬工業(株)）を中性流動食に添加して、pH4に調製した。また、酸性流動食の主要有機酸である乳酸については、乳酸の量を変化させて中性流動食に添加して試料を調製し、抗菌作用を検討した。

【0021】

発酵乳調製液と同じ有機酸を同量含む被験試料のpHは5.1であり、いずれの菌種についても抗菌作用を殆ど示さなかった。乳酸、酢酸のそれぞれを単独で中性流動食に添加して

pH4に調製した試料では、大腸菌、緑膿菌、黄色ブドウ球菌、MRSAに対する抗菌作用が観察された（図3）。クエン酸添加試料の上記4菌種に対する抗菌作用は、同じpHの乳酸または酢酸添加試料と比較して弱いものであった（図3）。一方、酸性流動食及び発酵乳製品の主要有機酸である乳酸は、0.5ml（pH4.8）では殆ど抗菌作用が認められなかったが、pH4に調製したときは大腸菌、緑膿菌、黄色ブドウ球菌に対し顕著な抗菌作用を示した（図4）。この結果を踏まえ酸性流動食の抗菌成分を考えると、酸性流動食に含まれる有機酸量から換算して、単独で抗菌作用を示す酢酸、クエン酸量は含まれていないことから、酸性流動食の抗菌作用の主たる因子は乳酸であると考えられる。

【0022】

MRSAに対する抗菌作用については、独特な傾向が得られた。すなわち、MRSAに対する各有機酸の抗菌作用は、酢酸が最も強く、次にクエン酸、乳酸の順であった。発酵乳製品の主な有機酸である乳酸の抗菌作用は弱く、黄色ブドウ球菌に比べ、MRSAが乳酸耐性となっていることがわかる。酸性流動食は発酵乳調製液と比較してMRSAに対する抗菌作用が顕著であることから、酸性流動食によるMRSA抗菌作用には発酵乳製品成分以外の成分が関与していると考えられる。

【0023】

乳酸などの有機酸に抗菌作用があることはこれまでも知られている。微生物の生育に対する酸の阻止作用は水素イオン濃度に依存し、同じpHの場合は塩酸や硫酸などの無機酸よりも、乳酸や酢酸などの有機酸の方が強い抗菌作用が示すといわれている。サルモネラ菌の場合、酢酸やプロピオン酸での生育可能な最低pHはpH5.4であり、乳酸ではpH4.4である。このように、単に水素イオン濃度だけでは説明できない部分もあり、抗菌作用には陰イオンあるいは非解離分子も関与していると思われる（非特許文献1）。

【0024】

乳酸菌の生成する抗菌性物質として、乳酸の他に、複製する少量の揮発性脂肪酸（酢酸、蟻酸）、過酸化水素、 β -ヒドロキシプロピオンアルデヒド（ロイテリン）、2-ピロリドン-5-カウボン酸などの一群の低分子量化合物が挙げられる（非特許文献2）。また、乳酸菌の生成するバクテリオシンとして*Lactococcus lactis* subsp. *lactis*が生成するナイシン、*Lactobacillus gasseri* LA-39が生成するガセリシンAなどが知られている（非特許文献3）。乳酸菌の持つプロバイオティクス効果として、腸管上皮への病原菌付着抑制効果、抗菌物質産生による感染症の治療・予防効果、腸内環境整備やマクロファージ活性化による宿主免疫能刺激効果、下痢・便秘予防効果が知られている（非特許文献4）。酸性流動食には、これらプレバイオティクス効果も期待することができる。

【図面の簡単な説明】

【0025】

【図1】酸性流動食、中性流動食、発酵乳調製液のグラム陰性菌に対する抗菌作用を示す図である。

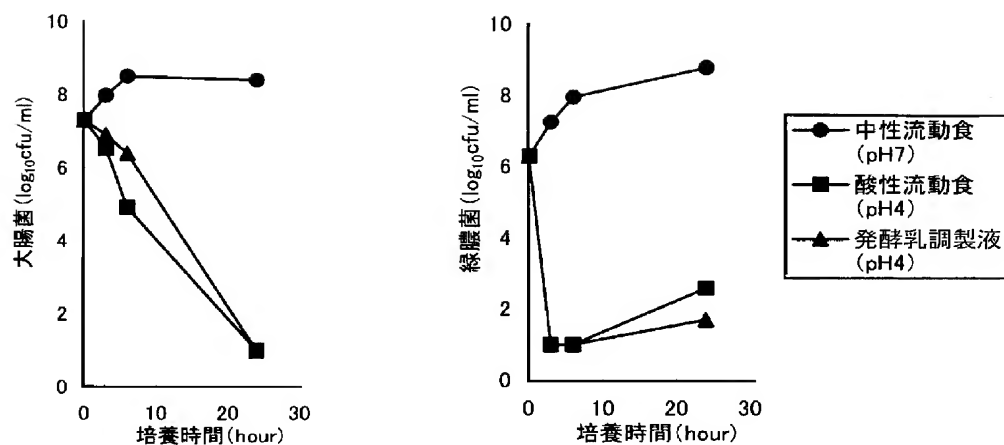
【図2】酸性流動食、中性流動食、発酵乳調製液のグラム陽性菌に対する抗菌作用を示す図である。

【図3】酢酸、乳酸、クエン酸の各種病原菌に対する抗菌作用を示す図である。

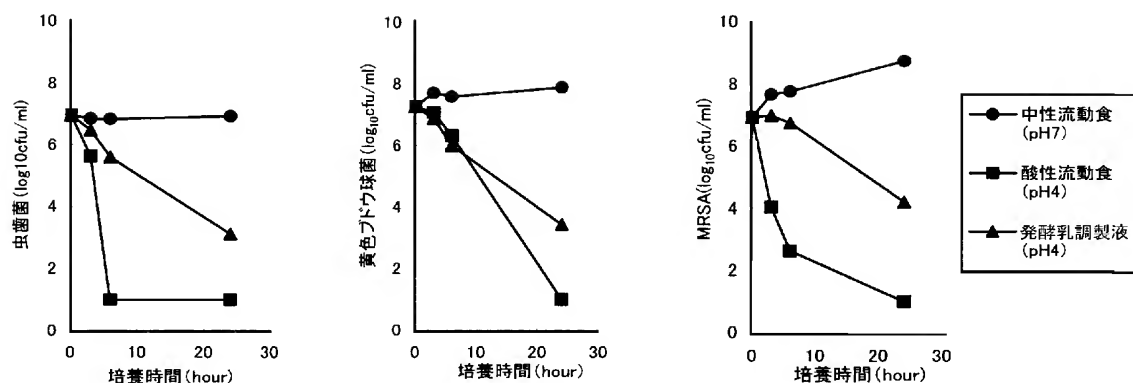
【図4】乳酸の各種病原菌に対する抗菌作用を示す図である。

【書類名】 図面

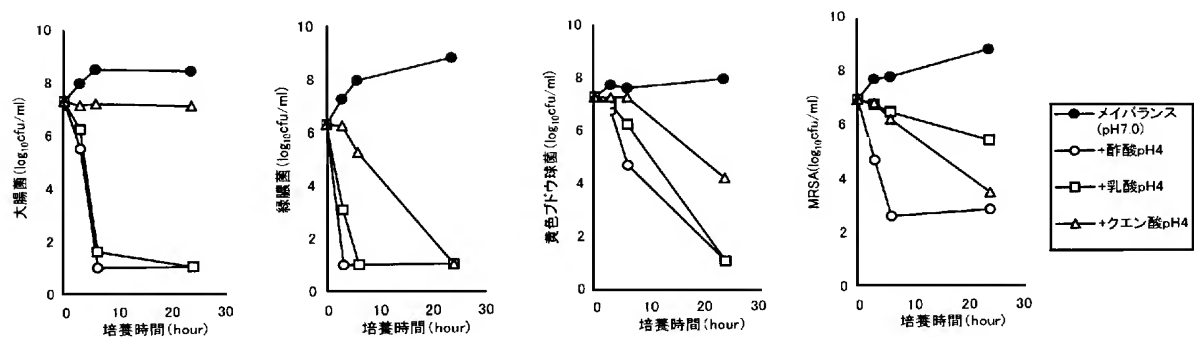
【図 1】



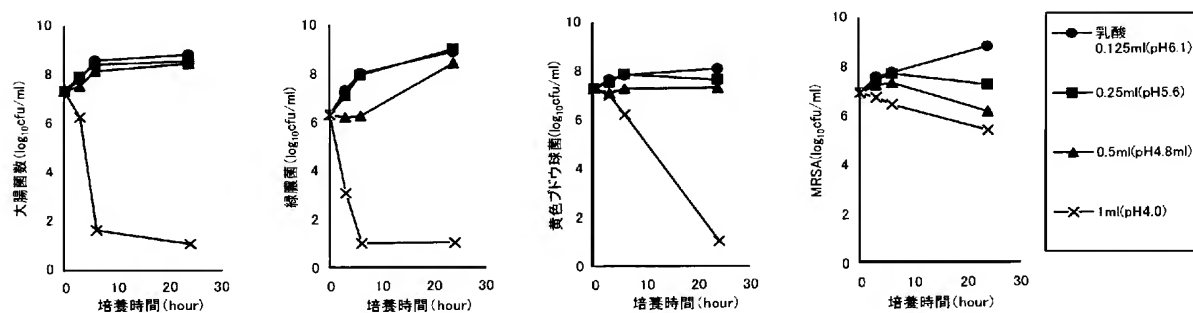
【図 2】



【図 3】



【図 4】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 感染防御手段となり得る抗菌活性を有する組成物の提供を課題とする。

【解決手段】 タンパク質源として乳発酵製品を含むために酸性となっている酸性流動食に着目した。ヨーグルトなどの発酵乳に抗菌作用があることは既に知られているが、予想外なことに、該酸性流動食はグラム陽性菌に対し、原料である乳発酵製品よりも強い抗菌作用を示した。

【選択図】 なし

職権訂正履歴（職権訂正）

特許出願の番号	特願 2 0 0 4 － 1 0 7 0 3 1
受付番号	5 0 4 0 0 5 4 8 3 6 5
書類名	特許願
担当官	金井 邦仁 3 0 7 2
作成日	平成 1 6 年 4 月 6 日

<訂正内容 1>

訂正ドキュメント

書誌

訂正原因

職権による訂正

訂正メモ

【特許出願人】の欄に誤りがあったため、下記のとおり訂正します。

訂正前内容

【特許出願人】

【住所又は居所】 0 0 0 0 0 6 1 3 8

【氏名又は名称】 明治乳業株式会社

訂正後内容

【特許出願人】

【識別番号】 0 0 0 0 0 6 1 3 8

【氏名又は名称】 明治乳業株式会社

出願人履歴

0 0 0 0 0 6 1 3 8

20011002

住所変更

東京都江東区新砂 1 丁目 2 番 1 0 号

明治乳業株式会社